



Application

# KAPA HyperPlus KitによるPCRフリー、断片化装置フリー、磁性ビーズほぼフリーのライブラリーの作製実例

製品名

KAPA HyperPlus Kit (for illumina) (KK8510, KK8512, KK8514)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) DNA シーケンシングセクション 神田 美幸 様のご厚意により掲載させていただきました。

本アプリケーションノートは、第4回NGS現場の会のスポンサードセッションの発表内容を元に編集しました。

## 背景

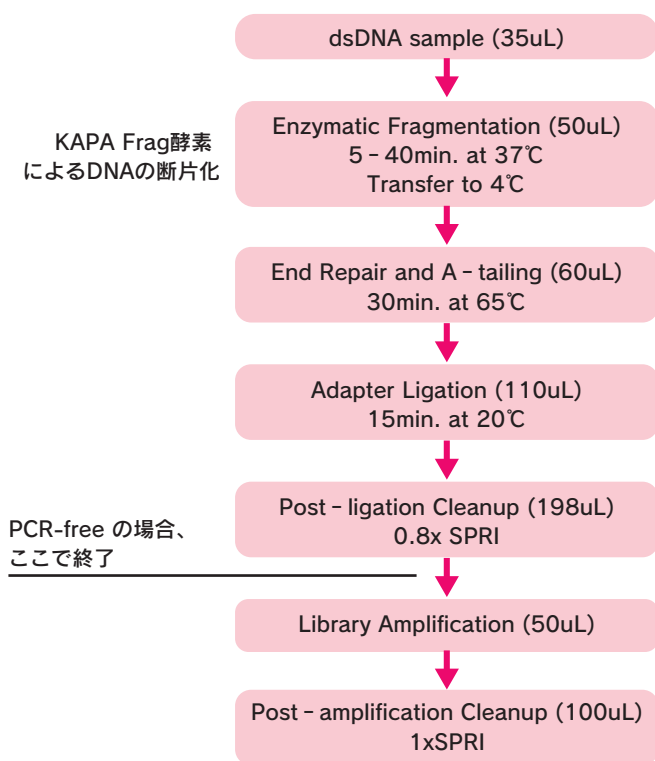
私達のセクションでは、多種多様なサンプルを取り扱っています。

取り扱うサンプルには希少なものが多く、十分なサンプル量が確保できないこともあります。したがって、「少ないサンプル量から、いかに効率よくシーケンスデータを得るか」が非常に重要です。

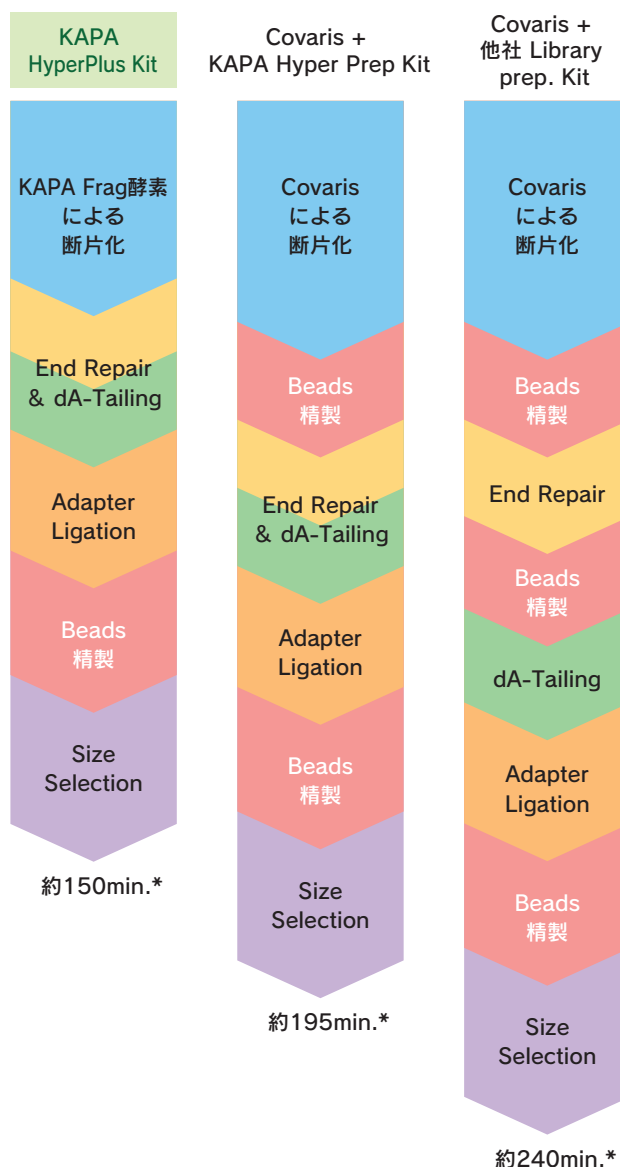
そこで、今回は KAPA HyperPlus Kit を使用して、従来の方法と比較をしながら、より良いライブラリ作製の手法を探索しました。

## Workflow

### [KAPA HyperPlus Kit]



沖縄科学技術大学院大学 (OIST) DNA シーケンシングセクションでは、多種多様なサンプルを取り扱っています。左の写真は、多種多様なサンプルの中でも、海洋生物の中の1つであるサンゴの写真です。

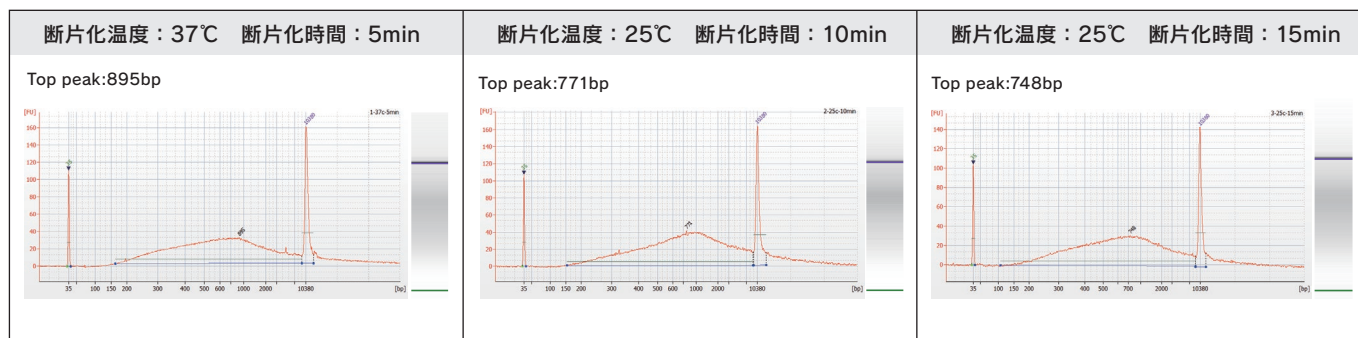


\* 全て PCR-free の Workflow で計算

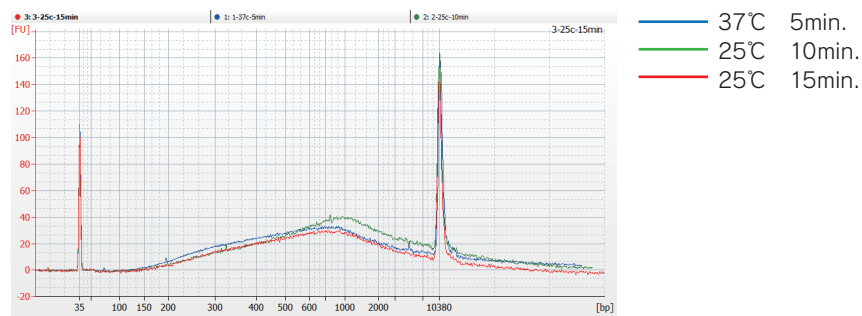
**実験 1** genomic DNAの断片化の検証**方法**

Input DNA: λDNA (Takara, cat.no. 3010)  
 Input DNAバッファー組成: TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)  
 断片化条件: 37°C 5min (KAPA HyperPlus Kit 推奨条件)  
                   25°C 10min  
                   25°C 15min  
 Target size: 500~600bp

dsDNA	XuL
Conditioning Solution	YuL (depends on EDTA conc.)
KAPA Frag Buffer	5uL
KAPA Frag Enzyme	10uL
total	50uL

**結果** 〈断片化後、EndRepair+dA-Tailing前の状態でのサイズ分布〉

上記の3つのグラフを重ね合わせた結果が下記である。

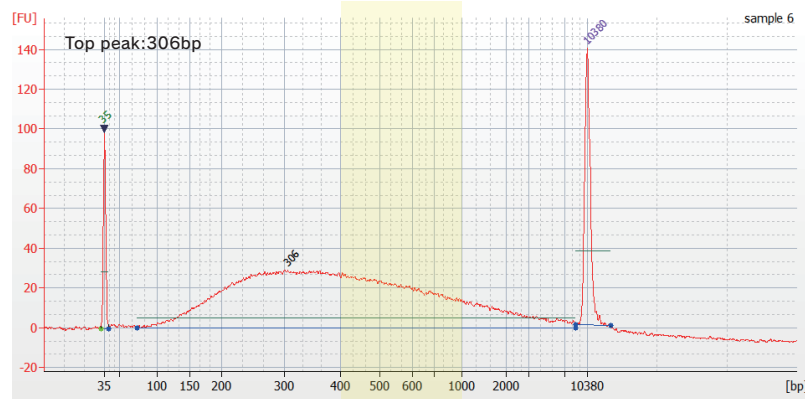


37°C 5minと25°C 15minは、ほぼ同程度のサイズ分布になった。25°C 15minのほうが37°C 5minよりも反応が“穏やかに”進むため、操作上による断片化のばらつきがより少なくなると考え、25°C 15minでの反応を採用した。

**DNA溶液中のEDTA濃度に関する評価**

Input DNAバッファー組成が不明確だったため、組成をTE:10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH~8.0と仮定してConditioning solutionを使用して断片化を行ったところ、目的サイズに断片化されなかった (想定より短い断片が得られた)

Target size: 500~600bp  
 400~1000bpを黄色で表示



dsDNA	XuL
Conditioning Solution	YuL (depends on EDTA conc.)
KAPA Frag Buffer	5uL
KAPA Frag Enzyme	10uL
total	50uL

確認したところ、Input DNAバッファー組成は、Low TE: 10mM Tris-HCl 0.1mM EDTA pH~8.0であり、予想より低いEDTA濃度であった。以上の結果により、DNA溶液中のEDTA濃度をきちんと把握しておき、適切な試薬調製をすることが重要であることがわかった。

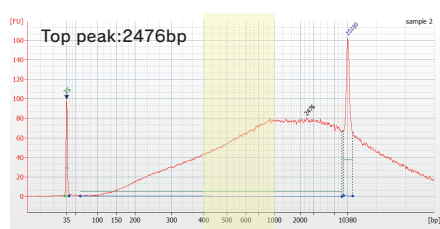
**実験 2** 海産無脊椎動物 9種類における断片化の検証**方法**

生物種：海産無脊椎動物 (1~9)  
 Input DNA量：500ng (Sample 1~6) 800ng (Sample 7~9)  
 Input DNA抽出方法：PCI 法, Aurora, Maxwell, Gel-plug 法など様々…  
 Input DNAバッファー組成：TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)  
 断片化条件：25℃ 15min  
 Target size：500~600bp

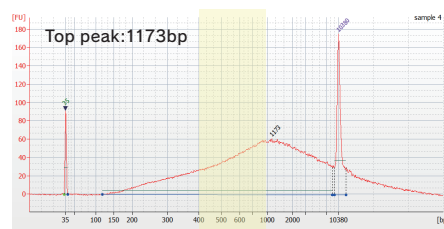
**結果** 〈断片化後、EndRepair+dA-Tailing前の状態でのサイズ分布〉

400bp~1000bpを黄色で表示

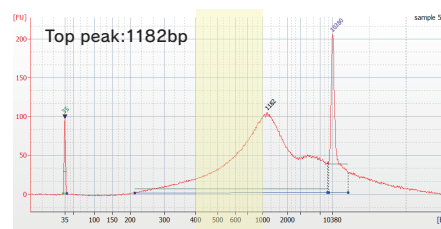
Sample 1



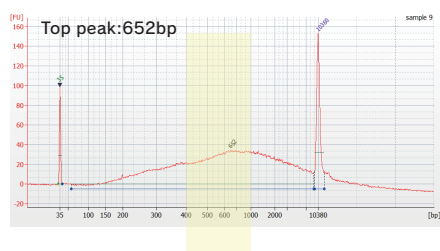
Sample 2



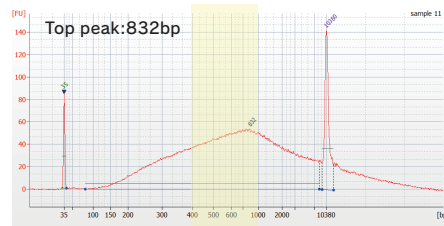
Sample 3



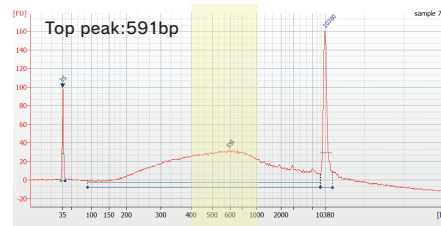
Sample 4



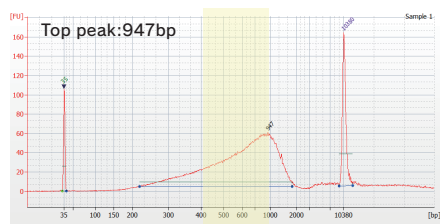
Sample 5



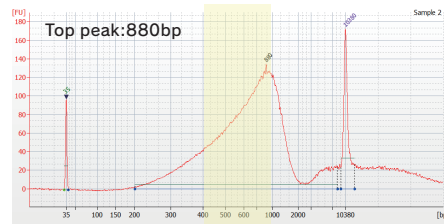
Sample 6



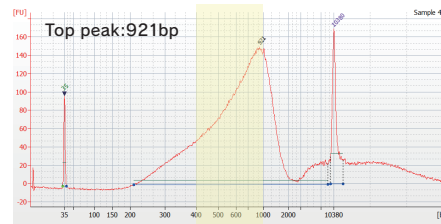
Sample 7



Sample 8



Sample 9



以上の結果により、生物種および、抽出方法に関わらず、目的サイズへの断片化が示唆された。

沖縄科学技術大学院大学 OIST



2011年11月 設立  
 2012年9月～ 学生受入開始 (81名/23カ国)

51 研究ユニット **生命科学・物理科学・数学 (387名)**  
**事務スタッフ (219名)**

沖縄科学技術大学院大学 (OIST)  
 DNA シーケンシングセクションを含む

**実験 3** 海産無脊椎動物 4種類 (A, B, C, D) におけるライブラリの作製 (PCR-free)

**方法**

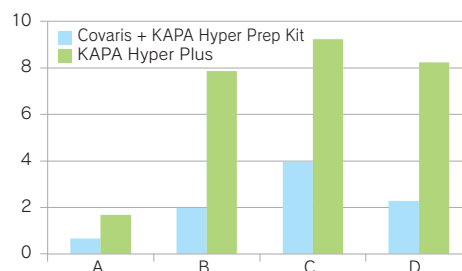
生物種: 海産無脊椎動物 (A~D)  
 Input DNA量: 200ng (Sample A) 800ng (Sample B~D)  
 Input DNA抽出方法: アガロースゲルで細胞を包埋した後に DNA 抽出  
 Input DNAバッファー組成: TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)  
 断片化方法:  
 ・Covaris  
 ・KAPA HyperPlus Kit

断片化条件:  
 ・Covaris:  
 microTUBE 130  $\mu$ L sample (サンプル濃度: 1.53ng/ $\mu$ L)  
 Intensity: 3  
 Duty Cycle: 5%  
 Cycles per Burst: 200  
 Treatment Time: 80sec.  
 Temperature: 8.5 $^{\circ}$ C  
 ・KAPA HyperPlus Kit: 25 $^{\circ}$ C 15min  
 ・Target size: 500~600bp

**結果**

海産無脊椎動物 A~D

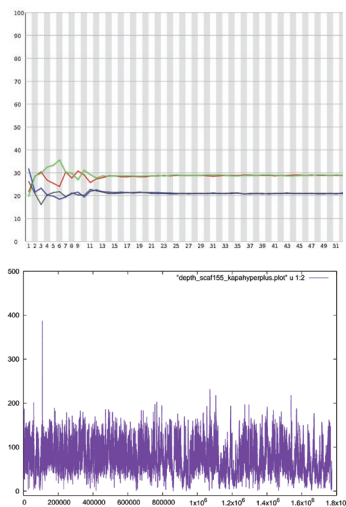
	KAPA HyperPlus			Covaris + KAPA Hyper Prep Kit		
	input DNA量 (ng)	ライブラリ濃度 (nM)	ライブラリ量 (uL)	input DNA量 (ng)	ライブラリ濃度 (nM)	ライブラリ量 (uL)
A	200	1.69	30	200	0.67	30
B	800	7.87	30	800	1.99	30
C	800	9.23	30	800	3.95	30
D	800	8.23	30	800	2.29	30



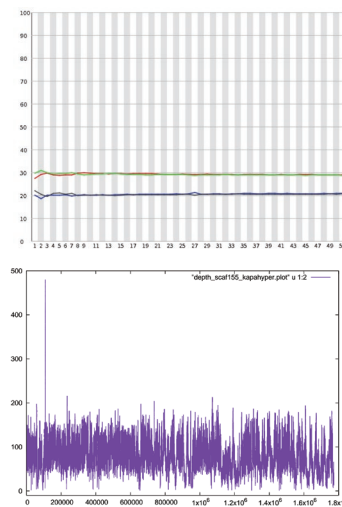
Covaris + KAPA Hyper Prep Kitと比較して、KAPA HyperPlus Kitのライブラリの収量は平均3.09倍上がった。

海産無脊椎動物AのFASTQCデータ

## KAPA HyperPlus Kit



## Covaris + KAPA Hyper Prep Kit



## ● ショットガンライブラリ MiSeq v3 300x2

KAPA HyperPlus Kit	ライブラリ濃度(nM)	ライブラリ量(uL)	Covaris + KAPA Hyper Prep Kit	ライブラリ濃度(nM)	ライブラリ量(uL)
Sample A	1.69	30	Sample A	0.67	30

## Miseq v3 300PE

	Final Conc. (pM)	Yield Total (Gb/lane)	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Clusters PF (%)	%>=Q30
Sample A	17.0	18.8	1573 +/- 56	84.29 +/- 2.06	71.1

ショットガンリードのアセンブル結果 (Platanus)

※ただし、今回はクラスター数が高いため、パスフィルタや Q30 の値が少し悪かった

	Total size (bp)	# of ConGgs	Largest ConGg (bp)	N50
KAPA HyperPlus Kit	175,499,533	285,726	128,088	1,735
Covaris + KAPA Hyper Prep Kit	181,920,766	272,684	97,927	2,045

## ● ショットガンライブラリ MiSeq v3 300x2 + メイトペアライブラリ (2kb, 3kb, 4kb, 6kb, 10kb) Hiseq Rapid 125x2 アセンブル結果 (Platanus)

	Total size (bp)	# of ConGgs	N50
KAPA HyperPlus Kit	148,985,334	163,541	126,525
Covaris + KAPA Hyper Prep Kit	142,096,387	99,441	147,695

読み始めに多少の塩基の偏りが生じたが、読まれる領域に偏りは生じていなかった。

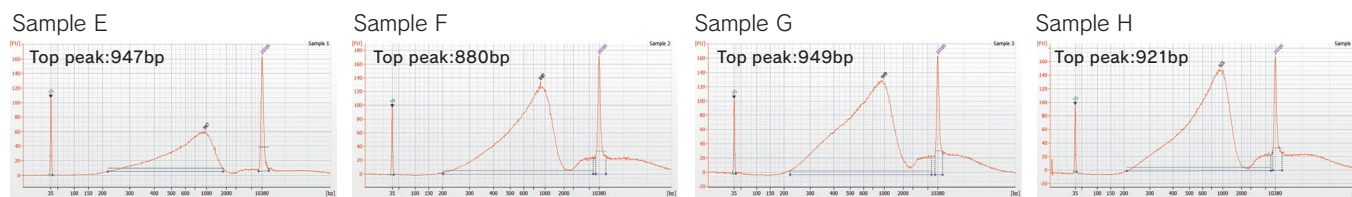
**実験 4** KAPA HyperPlus Kit による造礁サンゴゲノム (E, F, G, H) のショットガンライブラリ作製 (PCR-free)

**方法**

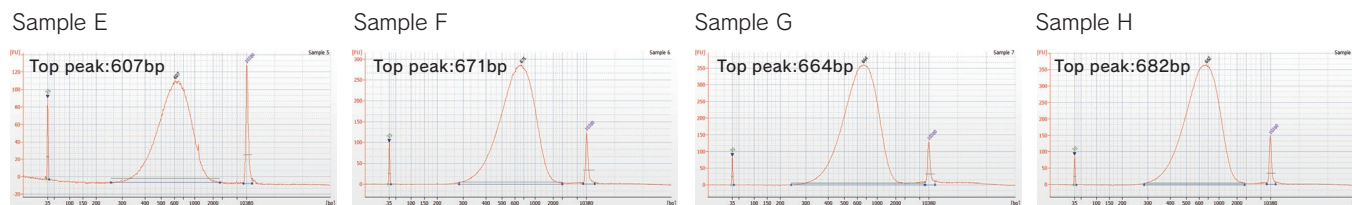
生物種: 造礁サンゴゲノム (E, F, G, H)  
 Input DNA量: 800ng  
 Input DNA抽出方法: アガロースゲルで細胞を包埋した後に DNA 抽出  
 Input DNAバッファー組成: TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)  
 断片化条件: 25°C 15min  
 Target: size 500~600bp

**結果**

## KAPA Frag酵素 による断片化後



## 作製ライブラリ


 KAPA HyperPlus Kit で作製した  
 ショットガンライブラリ

+

 メイトペアライブラリ  
 ( 3kb, 7kb, 10kb, 15kb以上 )

HiSeq Rapid v2 250 x2

## HiSeq Rapid v2 250PE

サンゴ	Final Conc. (pM)	Yield Total (Gb/lane)	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Clusters PF (%)	%>=Q30
サンゴ	14.0	217.9	1027 +/- 131	95.89 +/- 1.97	86.9

## 造礁サンゴ E~H 4種のゲノム解析

	Total size	# of sequences	N50
サンゴ E	454,192,219	14237	363,975
サンゴ F	529,138,992	11300	476,442
サンゴ G	563,907,226	10880	604,075
サンゴ H	529,719,235	8010	357,205

遺伝子予測など下流の解析へ進むために十分なアセンブル結果を得ることが出来た。



お客様のコメント

KAPA HyperPlus Kit は、ライブラリ作製効率が非常に良いので、今まで DNA 量に限りがあったシーケンスが不可能だったサンプルでも PCR-free のライブラリ作製が可能になりました。量に限りがあるサンプルのシーケンスに、とても有効だと感じました。

これまで PCR-free のゲノムショットガンライブラリ (de novo ゲノム解析) を作製するには  $\mu\text{g}$  スケールの DNA が必要でしたが、KAPA HyperPlus Kit では数百 ng の DNA があれば十分になり、必要量が従来の 1/5-1/10量位になった ということを実感しました。

また、断片化装置が不要であり、ライブラリ調製過程の精製が最小限で済むので、ロボットを使用したライブラリ作製にも取り入れやすいです。